

La inoculación con hongos micorrícicos y la aplicación de ácido salicílico aumentan la tolerancia a cobre en plantas de pimiento.

Inoculation with mycorrhizal fungi and application of salicylic acid increase copper tolerance in pepper plants.

A inoculação com fungos micorrízicos e a aplicação de ácido salicílico aumentam a tolerância ao cobre em plantas de pimentão.

Bernardo Valeria^{1,2}, Collado Florencia¹, Arango Cecilia¹, Garita Sebastian¹, Ruscitti Marcela^{1,3}

¹INFIVE (CCT CONICET La Plata) - Fac. Cs Agr y Ftales (UNLP) ²CICBA, ³ECANA - UNNOBA
marcelaruscitti@gmail.com

Resumen

Los metales pesados pueden acumularse en el suelo como consecuencia de la acción antrópica o debido a factores naturales afectando el crecimiento de las plantas. La simbiosis que se establece entre plantas y hongos formadores de micorizas arbusculares ha demostrado mejorar la tolerancia de las plantas a distintas situaciones de estrés, como la toxicidad por metales pesados, constituyéndose en una herramienta potencial para el manejo de plantas cultivadas bajo estas condiciones. También se ha reportado que el ácido salicílico (AS), regulador de crecimiento vegetal, incrementa la tolerancia al estrés de los cultivos. Se estudió el efecto del AS en situaciones de estrés por cobre en plantas de pimiento no micorrizadas y micorrizadas con *Funneliformis mosseae*. Se evaluaron las siguientes concentraciones de cobre: 0; 0,1 y 1mM ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en plantas pulverizadas con 0; 200 y 500 μM de AS. Se determinó % de micorrización, % de viabilidad, altura, peso seco, área foliar, índice de verdor, contenido de malonildialdehído y proteínas de hoja y raíz. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron a través del análisis de la varianza (ANOVA). Los parámetros de crecimiento disminuyeron al aumentar la concentración de Cu y las plantas inoculadas mostraron mejores resultados que las no inoculadas. Las plantas micorrizadas presentaron menor concentración de malonildialdehído que las no micorrizadas, tanto en hojas como raíces. El contenido de proteínas fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas y disminuyó frente al estrés por cobre tanto en hojas como raíces. El AS mostró respuestas variables según el parámetro analizado, habiendo una mayor respuesta en parámetros morfológicos.

Palabras clave: metales pesados - micorizas arbusculares - *Capsicum annuum*

Summary

Heavy metals can accumulate in the soil and affect plant growth due to anthropic or natural factors. The symbiotic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and plants has been shown to improve plant tolerance to different stress situations, such as heavy metal toxicity, thus constituting a potential tool for the management of plants grown under these conditions. It has also been reported that salicylic acid (SA), a plant growth regulator, increases stress tolerance in crops. The effect of SA was studied on copper-stressed pepper plants without mycorrhizae and mycorrhizae with *Funneliformis mosseae*. The concentrations of copper evaluated were 0; 0.1; and 1 mM ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in plants sprayed with 0; 200 and 500 μM SA. We determined mycorrhization %, viability %, height, dry weight, leaf area, green index, malonildialdehyde content and leaf and root proteins. Data were analyzed by ANOVA. Growth parameters decreased with increasing Cu concentration, and better results were obtained in inoculated than in non-inoculated plants. Mycorrhizal plants had lower concentrations of malonildialdehyde than non-mycorrhizal plants, both in leaves and roots. Protein content was higher in inoculated plants than in non-inoculated plants and decreased in the presence of copper stress, in both leaves and roots. SA showed variable responses according to the parameter analyzed, with a higher response in morphological parameters.

Keywords: heavy metals-arbuscular mycorrhizal-*Capsicum annuum*

Resumo

Os metais pesados podem se acumular no solo como resultado da ação antropogênica ou devido a fatores naturais, afetando o crescimento das plantas. A simbiose estabelecida entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares mostrou melhorar a tolerância das plantas a diferentes situações de estresse, como a toxicidade de metais pesados, constituindo uma ferramenta potencial para o manejo de plantas cultivadas nessas condições. Também foi reportado que o ácido salicílico (AS), um regulador do crescimento vegetal, aumenta a tolerância ao estresse das culturas. Foi estudado o efeito do AS em situações de estresse por cobre em plantas de pimentão não micorrizadas e micorrizadas com *Funneliformis mosseae*. Foram avaliadas as seguintes concentrações de cobre: 0; 0,1 y 1mM ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em plantas pulverizadas com 0; 200 e 500 μM de AS e foram determinadas as porcentagens de micorrização, de viabilidade, altura, peso seco, área foliar, índice de verdor, teor de malonildialdeído e proteínas foliares e radiculares. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA). Os parâmetros de crescimento diminuíram com o aumento da concentração de Cu e as plantas inoculadas apresentaram melhores resultados que as não inoculadas. As plantas micorrizadas apresentaram menor concentração de malonildialdeído do que as não micorrizadas, tanto nas folhas como nas raízes. O teor de proteína foi maior nas plantas inoculadas em comparação com as não inoculadas e diminuiu perante ao estresse de cobre nas folhas e nas raízes. O AS apresentou respostas variáveis de acordo com o parâmetro analisado, com maior resposta nos parâmetros morfológicos.

Palavras-chave: metais pesados - micorizas arbusculares - *Capsicum annuum*

Introducción

Argentina es el principal productor de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Sudamérica, ocupando una superficie que varía de 3000 a 6000 has desde la provincia de Jujuy hasta Río Negro. Las principales zonas productoras de pimiento para consumo en fresco, tanto a campo como en invernadero, son Buenos Aires, Salta y Corrientes (Del Pino, 2016). El Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP), localizado en la periferia de la ciudad de La Plata, constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense. El pimiento ocupa el tercer lugar (24%) de la superficie cultivada en el CHLP después de la lechuga y el tomate (Del Pino, 2016). Esta especie, conocida como morrón, pertenece a la familia Solanáceas. Es una planta que requiere suelos franco-arenosos, bien drenados, presentando moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo como del agua de riego.

La horticultura ha experimentado una transformación radical de los sistemas productivos durante las últimas décadas; la incorporación de invernaderos para cultivo bajo cubierta, el riego por goteo, el uso de cultivares mejorados e híbridos, el empleo de fertilizantes y fitosanitarios, ha aumentado la producción de las cosechas. En contrapartida, los problemas socio-ambientales de la horticultura bonaerense, son notorios, tal como lo muestra la presencia de residuos químicos derivados de los fertilizantes y fitosanitarios en los productos cosechados, en el suelo y en las aguas subterráneas (Bocer, 2002; Souza Casadinho & Bocero, 2008).

En la actualidad, los suelos agrícolas están de ligera a moderadamente contaminados por distintos metales pesados (MP) como consecuencia de la actividad agropecuaria e industrial prolongada (Schwartz et al., 2003). La toxicidad de los MP para las plantas varía en función de la concentración, el estado de oxidación y la persistencia, dado que, en su justa medida, algunos resultan indispensables (Navarro Aviñó et al., 2007). En altas concentraciones los MP inhiben la actividad de las proteínas por alteración de su estructura generando deficiencias y presencia de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) provocando como consecuencia estrés oxidativo (Yadav, 2010). La sensibilidad de las plantas a los MP depende no solo de la concentración sino también del estado de desarrollo de la planta al ser expuesta al mismo (Liu et al., 2005).

El cobre es uno de los MP que más afecta los suelos agrícolas, ya que está presente en la formulación de muchos fertilizantes y productos fitosanitarios (fungicidas), que se acumulan en los horizontes superficiales (Kabata-Pendias, 2011). El exceso de Cu en los suelos del CHLP puede ser una problemática a tenerse en cuenta debido al uso durante décadas de fungicidas de semillas y la aplicación de Caldo Bordelés (fungicida foliar en base a sulfato de cobre) como práctica habitual de los productores de la región.

El Cu es un cofactor de numerosas enzimas vegetales, que participa en procesos fisiológicos claves como la respiración, la fotosíntesis, la reducción y fijación del nitrógeno, el metabolismo de las proteínas y de la pared celular. También está involucrado en el control de la permeabilidad del xilema, la regulación de la síntesis de DNA y RNA y en reacciones de óxido-reducción (Kabata-Pendias, 2011). Este metal tiende a acumularse en la raíz, con baja translocación a la parte aérea alterando el crecimiento y la morfología de la raíz (Marschner, 1995). No obstante, el exceso de cobre inhibe el crecimiento de la parte aérea (Lidon & Henriques, 1992; Murphy & Taiz, 1997; Ruscitti et al., 2017).

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias que activan su sistema de defensa ante diversas situaciones de estrés. La Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) puede ser inducida por agentes bióticos (patógenos atenuados) o abióticos (compuestos químicos) y se asocia al incremento de la concentración de ácido salicílico (AS) (ácido 2-hidroxibenzoico) en los tejidos vegetales. Numerosos trabajos dan cuenta del efecto positivo del AS sobre la regulación del estrés oxidativo generado como consecuencia de la presencia de elevadas concentraciones de MP en el suelo (Metwally et al., 2003; Drazic & Mihailovic, 2005; El-Tayeb et al., 2006; Zhang et al., 2015). Investigaciones recientes muestran que el tratamiento preliminar de las plantas con bajas concentraciones de AS podría tener un efecto de aclimatación, aumentando la tolerancia hacia la mayoría de los estreses abióticos, debido principalmente a una mejora en la capacidad antioxidante (Horvath et al., 2007).

Las micorrizas arbusculares (MA) son una asociación simbiótica, de carácter mutualista, que se establece entre la mayoría de las plantas vasculares y algunos hongos benéficos del suelo, y probablemente son, en abundancia, las más importantes (Sarabia Ochoa et al., 2010). Esta estrategia evolutiva se conoce desde hace más de un siglo, aunque en las últimas décadas se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la horticultura, la agricultura y las forestaciones, para las que hay evidencias sobre su eficiencia (Pawlowska & Charvat, 2004; Ruscitti et al., 2011). La simbiosis facilita la absorción de agua y de iones minerales como P, N, K, Ca, Mg, Fe, Mn. Entre otras ventajas, las micorrizas arbusculares pueden conferir tolerancia a las plantas frente a situaciones de estrés hídrico, salino, por deficiencia de nutrientes, residuos de la industria petrolera, exceso de metales pesados o sustancias fitotóxicas y patógenos (Linderman, 1992; Cabello, 1997; Kaya et al., 2009; Beltrano et al., 2013; Ruscitti et al., 2017).

Uno de los mecanismos implicados en el incremento de la tolerancia de las plantas micorrizadas a los metales pesados, implica un aumento en la absorción y en el transporte raíz – tallo de los MP en las plantas micorrizadas (fitoextracción), mientras que en otros casos, el hongo contribuye a la inmovilización de los MP en el suelo (fitoestabilización). Según Marschner & Dell (1994), las hifas externas de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pueden absorber y transportar el cobre, en las plantas micorrizadas, aumentando la concentración en los tallos y raíces. Esta respuesta depende no sólo de la especie vegetal, el hongo y las condiciones edáficas sino también de la concentración del metal. Ruscitti et al. (2017) demostraron que en plantas de pimiento micorrizadas, a bajas concentraciones el cobre se acumulaba en las raíces, mientras que a mayores concentraciones se translocaba a la parte aérea.

Si bien existe vasta bibliografía sobre la protección que ejerce la micorrización sobre el estrés por metales pesados, y también del AS en estas situaciones, poca es la información sobre la interacción de la simbiosis y la aplicación de inductores de resistencia en el estrés por MP.

En función de lo expuesto se planteó la hipótesis de que la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y el AS aplicado en forma exógena generan un efecto sinérgico aumentando la tolerancia de las plantas de pimiento al exceso de Cu en el suelo. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la micorrización y la aplicación de AS en plantas de pimiento creciendo en un sustrato con elevadas concentraciones de cobre.

Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en invernáculo con temperatura controlada y fotoperiodo natural entre los meses de agosto y diciembre en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (34°S, 58°O).

Un total de 108 semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv. Almuden, desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, y enjuagadas con agua estéril se sembraron en speedlings de 250 cm³ de capacidad por celda, con una mezcla tinalizada de perlita:vermiculita:arena (1:1:1). A la mitad de las celdas se le incorporó inóculo de *Funneliformis mosseae* (M) y a la otra mitad inóculo inactivado (por autoclavado a 120 °C durante 30 min) (NM), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo estaba constituido por una mezcla de sustrato, hifas, esporas (40 a 70 esporas g⁻¹ de inóculo) y fragmentos de raíces de trébol (*Trifolium repens* L.) micorrizadas con *Funneliformis mosseae* (M) (aislado SB1, Colección del Instituto Spegazzini, UNLP).

Cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas, 40 días después de la siembra (DDS), se comenzó con el tratamiento de ácido salicílico (AS); por aspersión foliar hasta llegar al punto de goteo, una vez por semana y hasta finalizar el ensayo. Se utilizaron las siguientes concentraciones de AS: 0 µM (0AS), 200 µM (200AS) y 500 µM (500AS), más el agregado de Tween 20 (Biopac) como emulsionante. A los 60 DDS, se comenzó con el tratamiento de Cu como CuSO₄·5 H₂O, incorporando al riego normal soluciones de 0 mM (0Cu); 0,1 mM (0,1Cu) y 1 mM (1Cu). Las elecciones de las dosis se determinó en función de trabajos previos (Ruscitti et al., 2017). Las plantas se regaron periódicamente con solución nutritiva Hoagland completa (Hoagland & Arnold, 1950) durante todo el ensayo.

Tabla 1: Tratamientos realizados

Tratamientos	Micorrización	CuSO ₄ 5H ₂ O (mM)	AS (µM)	Nº repeticiones
T1		0	0	6
T2		0	200	6
T3		0	500	6
T4	NM	0,1	0	6
T5		0,1	200	6
T6		0,1	500	6
T7		1	0	6
T8		1	200	6
T9		1	500	6
T10		0	0	6
T11		0	200	6
T12		0	500	6
T13	M	0,1	0	6
T14		0,1	200	6
T15		0,1	500	6
T16		1	0	6
T17		1	200	6
T18		1	500	6

Al final del ensayo (110 DDS), se realizaron las siguientes determinaciones:

- Peso seco por plantas (PS), mediante secado en estufa a 80°C hasta peso constante.
- Área foliar: mediante un scanner con un software para análisis de imágenes (Image J)
- Incremento diario de altura (cm), se calculó con la fórmula:

$$IDA = (A2 - A1) / D = \text{cm/día}$$

A1 y A2= altura inicial y final respectivamente
D= días transcurridos entre las mediciones

- Tasa de crecimiento relativo (TCR) expresa el crecimiento en peso seco a partir de 1 gramo de PS de la planta en un intervalo de tiempo (González et al., 1986), se calculó con la fórmula:

$$TCR = (\ln PS2 - \ln PS1) / (t2 - t1) = (\text{g/g día})$$

PS1= Peso seco inicial (g)
PS2= Peso seco final (g)
t1 y t2= tiempo (días)

- Índice de Verdor: se determinó con el medidor de clorofila Minolta SPAD 502, sobre la última hoja expandida constituyendo un estimador de contenido de nitrógeno en las hojas.

- Contenido de malondialdehído (MDA): se evaluó según el método de Heath & Packer (1968), como un indicador del daño provocado por el estrés, evidenciado por la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. Se tomaron 200 mg de peso fresco de hoja y raíz, y se maceraron con 1 mL de ácido tricloroacético al 0,1%, luego se centrifugaron. A 1 mL de sobrenadante se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1%, se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 1 mL del reactivo TCA-BHT-TBA (TCA 20%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,37% y butilhidroxitolueno (BHT) 0,01 g) seguidamente, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 95°C. Pasado este período, se introdujeron en un baño de hielo para detener la reacción y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Finalmente, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de 155 mM⁻¹ cm⁻¹:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol.mL}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155.000] 10^6$$

- Contenido de proteínas solubles: el contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 200 mg de la última hoja expandida o igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976).

- Micorrización: el porcentaje de micorrización (%M) se cuantificó de acuerdo a Touvelot et al. (1986). Para ello se seleccionaron en forma aleatoria fracciones de raíces no lignificadas y se procedió a clarificar y teñir según la técnica de Phillips & Hayman (1970). Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) y se teñieron con azul de tripán mediante la técnica de Phillips & Hayman (1970). Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1 cm de longitud, se montaron en portaobjetos observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, cada una de 10 fragmentos de raíz. De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras

fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructura (arbuscúlos, vesículas, hifas) presente dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (%M) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz observados, calculando también el porcentaje de arbuscúlos (%Ar) y vesículas (%V).

- Viabilidad micorrízica (%SDH): se evaluó la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa como indicador de la viabilidad de las estructuras fúngicas, basada en el porcentaje de micorrización, de acuerdo al procedimiento descrito por Smith & Gianinazzi-Pearson (1990).

- Dependencia micorrízica (DM): se estimó de acuerdo a Plenchette et al. (1983). Este índice permite evaluar la eficiencia de la

micorrización en la producción de biomasa, al relacionar el peso seco total de las plantas micorrizadas y no micorrizadas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$MD = \frac{PS \text{ de las plantas micorrizadas} - PS \text{ de las plantas no micorrizadas}}{PS \text{ de las plantas micorrizadas}} \times 100$$

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 2x3x3, con dos niveles de micorrización (NM; M), tres concentraciones de AS (0; 200 y 500 µM de AS) y tres concentraciones de cobre (0; 0,1 y 1 mM de CuSO₄.5H₂O) y seis repeticiones por tratamiento. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza de tres vías y las medias comparadas por el test de LSD al 5%.

Resultados y Discusión

En este trabajo todas las plantas de pimienta inoculadas mostraron colonización, a pesar del poder inhibitorio que el cobre ejerce sobre los hongos micorrízicos, ya sea porque inhibe la germinación de esporas o la propia colonización de las raíces (Jamal et al., 2002; Lin et al., 2007; Marques et al., 2007; Andrade et al., 2008; Ruscitti et al., 2017). Estos resultados coinciden con Joner & Leyval (2001) quienes afirmaron que los hongos micorrízicos pueden subsistir en suelos altamente contaminados con metales pesados.

Se observó una disminución del porcentaje de todas las estructuras fúngicas evaluadas con el aumento de la concentración de Cu, siendo más afectado el porcentaje de hifas respecto al porcentaje de vesículas. El porcentaje de hifas disminuyó un 51% con 0,1 mM de Cu y 77% con 1 mM de Cu con respecto a los tratamientos sin cobre. Lo mismo sucedió con el porcentaje de arbuscúlos y vesículas. Estos datos coinciden con lo expuesto por Ruscitti et al. (2017) quienes revelaron la sensibilidad a la toxicidad con Cu mediante la reducción del porcentaje de micorrización en pimienta (Tabla 2). En cuanto a la viabilidad de las estructuras fúngicas, determinada por la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, se observó una reducción significativa en las

plantas sometidas a estrés por Cu con respecto a las plantas sin Cu. Las plantas tratadas con inóculo inactivo no presentaron actividad de SDH. En los tratamientos con 0,1 mM y 1 mM de Cu, ambos sin aplicación de AS, el %SDH se redujo un 71% y un 84% con respecto a 0 mM de Cu y sin AS. La aplicación de AS no modificó estos resultados. El AS incrementó la dependencia micorrízica con las concentraciones de Cu evaluadas, demostrando un efecto sinérgico entre la micorrización y el AS (Tabla 2).

La inoculación con MA mitigó el efecto del estrés por Cu. Las plantas M mostraron un incremento diario de altura significativamente superior con respecto a las NM. Las plantas micorrizadas sometidas a 1 mM de Cu y asperjadas con 200 y 500 µM de AS presentaron un incremento diario de altura de 112 y 125% superior, con respecto a las que no recibieron AS respectivamente. La aplicación de AS + MA provocó un efecto sinérgico en este parámetro (Figura 1A). Esta tendencia se observó también en el peso seco, el cual disminuyó 80% en las plantas no micorrizadas y alrededor del 20% en las micorrizadas, respecto a las plantas sin Cu. En los tratamientos con 1 mM de Cu, las plantas asperjadas con 500 µM de AS incrementaron un 50% el peso seco con respecto a las que no fueron asperjadas (Figura 1B).

Tabla 2: Porcentaje de hifas (%H), arbuscúlos (%Ar), vesículas (%V), viabilidad micorrízica (%SDH) y dependencia micorrízica (DM) en plantas micorrizadas de pimienta, en los diferentes tratamientos de Cu y AS, determinada a los 110 DDT.

Cu (mM)	AS (µM)	H (%)	AR (%)	V (%)	SDH(%)	DM (%)
0	0	62aA	28aA	80aA	90aA	-
	200	44aA	5bA	70aA	81aA	-
	500	34aA	20aA	85aA	87aA	-
0,1	0	20aB	20aA	78aA	19aB	6,2bA
	200	27aAB	6bA	68aA	13aB	38,6aB
	500	22aA	6bB	73aAB	35bB	50,3aA
1	0	5aB	0aB	61aA	14aB	0,1bB
	200	12aB	2aA	66aA	9aB	78,4aA
	500	7aB	0aB	60aB	8aC	65,3aA
Efectos principales						
Cu		<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
AS		ns	<0,05	ns	ns	<0,05
Interacciones Cu x AS		ns	<0,05	ns	ns	ns

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de AS para cada concentración de Cu (p<0,05). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de Cu para cada concentración de AS (p<0,05). ns: no significativo

Figura 1: Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre A) incremento diario de altura (IDA) B) peso seco total (PS); C) área foliar (AF) y D) tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Fumeliformis mosseae* (M). Referencias: 0Cu: 0 mM Cu; 0,1Cu: 0,1 mM Cu; 1Cu: 1 mM Cu.; 0AS: 0 μM AS; 200AS: 200 μM AS; 500AS: 500 μM AS.

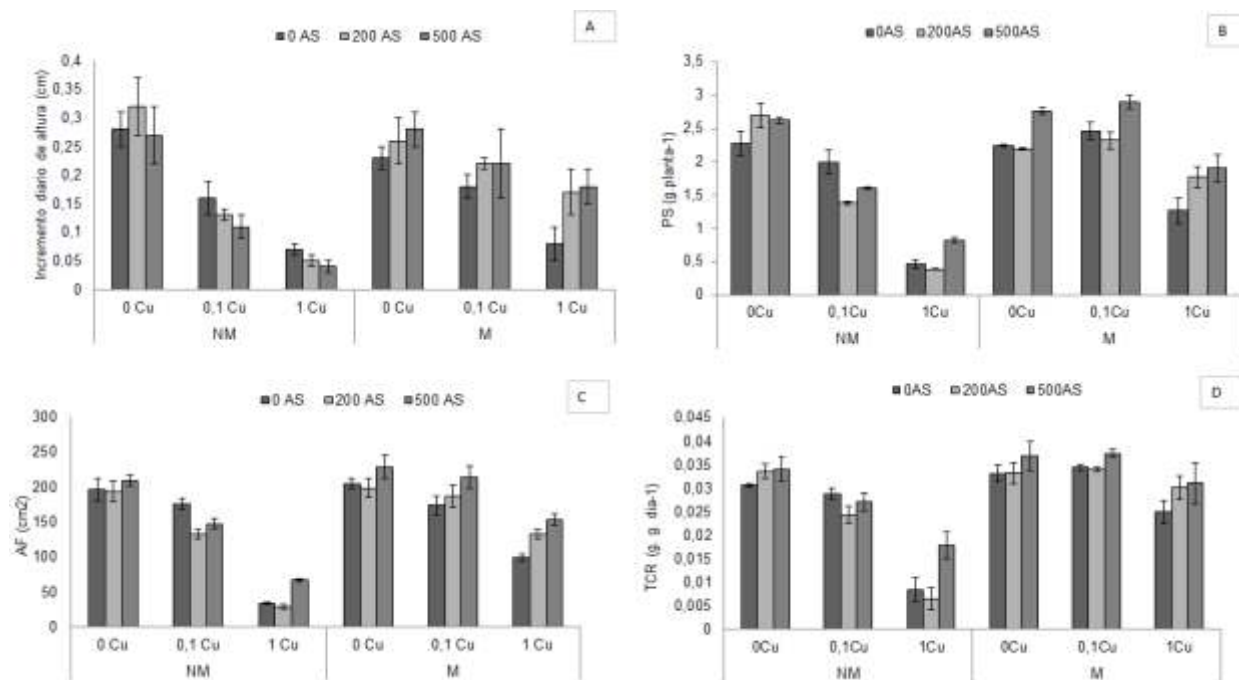


Tabla 3: Análisis de Varianza de los efectos de la micorrización (MICO), Cobre (Cu) y ácido salicílico (AS) y su interacción sobre el incremento diario de altura (IDA), peso seco (PS), área foliar (AF) y tasa de crecimiento relativo (TCR).

Fuente de variación	Gl	IDA		PS		AF		TCR	
		Cuadrado Medio	Valor-P	Cuadrado Medio	Valor-P	Cuadrado Medio	Valor-P	Cuadrado Medio	Valor-P
MICO	1	0,0247	0,0001	5,1535	0,0000	271100,8500	0,0001	0,0012	0,0000
Cu	2	0,1382	0,0000	9,0323	0,0000	68916,2300	0,0001	0,0010	0,0000
AS	2	0,0039	0,0585	0,5929	0,0000	3188,8100	0,0001	0,0001	0,0000
INTERACCIONES									
MICOxCu	2	0,0192	0,0000	1,9453	0,0000	6465,9500	0,0001	0,0003	0,0000
MICOxAS	2	0,0105	0,0011	0,2043	0,0086	1494,8400	0,0003	0,0000	0,2222
CuxAS	4	0,0009	0,6120	0,1837	0,0029	587,0000	0,0078	0,0000	0,0128
MICOxcCuxAS	4	0,0013	0,4147	0,1753	0,0038	618,4200	0,0060	0,0000	0,0094

Estos resultados concuerdan con otros autores en donde la altura y otros parámetros de crecimiento se vieron afectados en forma negativa por la presencia de metales pesados en el suelo, siendo menor el efecto del estrés en plantas que fueron inoculadas con hongos micorrízicos (Ruscitti et al., 2011; 2017). Los resultados encontrados coinciden con Rabie (2005) quien determinó, en ensayos de trigo y poroto colorado micorrizados con *Glomus mosseae* y expuestos a cobre, que la simbiosis disminuía el efecto negativo del cobre sobre el peso seco de las plantas. Del mismo modo Novoa & Palma (2010) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio utilizando plantas de alfalfa como huésped, inoculadas con *Glomus spp.*

El área foliar disminuyó significativamente con 1 mM de Cu tanto en las plantas NM como en las M, no obstante las M superaron en más del 50% a las NM. Esto concuerda con lo experimentado por diversos autores (Lidon & Henriques, 1992; Murphy & Taiz,

1997) quienes comprobaron que el exceso de cobre produce efectos tóxicos sobre las plantas, inhibiendo el crecimiento de la parte aérea. El AS redujo el efecto detrimental de las altas concentraciones de Cu en las plantas micorrizadas en forma significativa (Figura 1C). Las plantas que no fueron tratadas con Cu no mostraron diferencias en este parámetro frente a la aplicación de AS. Estos resultados conciden con Guzmán Tellez et al. (2011) quienes demostraron que en ausencia de estrés el efecto del ácido salicílico dependerá de la concentración aplicada y de la especie vegetal, encontrándose en ocasiones ausencia de efectos. En general, el uso de AS en forma de aspersión foliar muestra beneficios sobre el crecimiento de la parte aérea de las plantas sometidas a algún factor causante de estrés.

No se observaron diferencias significativas en la TCR entre plantas micorrizadas y no micorrizadas cuando crecieron sin Cu en el sustrato, mientras que las M superaron en forma significati-

Figura 2: Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el índice de verdor, medido con SPAD, de plantas de pimienta no inoculadas (NM) e inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0Cu: 0 mM Cu; 0,1Cu: 0,1 mM Cu; 1Cu: 1 mM Cu. 0AS: 0 μ MAS; 200AS: 200 μ MAS; 500AS: 500 μ MAS.

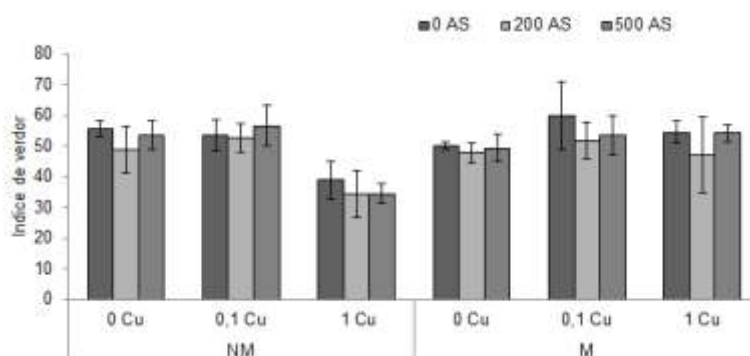


Tabla 4: Análisis de Varianza de los efectos de la micorrización (MICO), Cobre (Cu) y ácido salicílico (AS) y su interacción sobre el índice de verdor.

Índice de Verdor			
Fuente de variación	Gl	Cuadrado Medio	Valor-P
MICO	1	44,4630	0,2212
Cu	2	64,2872	0,1210
AS	2	16,2289	0,5729
INTERACCIONES			
MICOxCu	2	41,0869	0,2521
MICOxAS	2	75,0007	0,0871
CuxAS	4	5,4369	0,9423
MICOxcCuxAS	4	24,5571	0,4995

va a la NM en ambas dosis de Cu. A su vez las plantas asperjadas con concentraciones de 200 y 500 μ M de AS mostraron mayor tasa de crecimiento relativo en las plantas inoculadas con *F. mosseae* (Figura 1D).

El cobre es un micronutriente, pero al aumentar su concentración, se torna fitotóxico (Demirevska-Kepova et al., 2004; Vailant et al., 2005). La reducción del crecimiento de plantas sometidas a un estrés por MP ha sido relacionada al daño de las estructuras moleculares y supramoleculares y cambios fisiológicos debido a un estrés oxidativo (Lombardi & Sebastiani, 2005). Es posible que el mejor comportamiento observado en los parámetros de crecimiento bajo esta situación de estrés, se atribuya al alto porcentaje de colonización por HMA encontrado en este trabajo en las plantas de pimienta. La mayor tolerancia a metales pesados en las plantas inoculadas puede estar relacionada a que las raíces se vuelven más ramificadas y aumentan su biomasa, lo que les permite mejorar su capacidad de absorción de nutrientes. Por otro lado las plantas micorrizadas también aumentan la absorción y acumulación de MP en las raíces evitando su translocación hacia la parte aérea (Ruscitti et al., 2017).

En la Figura 2, se observa que hubo un mayor índice de verdor asociado a las plantas micorrizadas en altas concentraciones de Cu. La aplicación de AS no produjo diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados de la influencia del AS no coinciden con lo que describen Popova et al. (2003) y Singh & Usha (2003), quienes observaron que frente a condiciones de estrés, aquellas plantas que fueron asperjadas con AS mostraron un mayor contenido de clorofila frente a las no tratadas.

El Cu, Co, Pb y Cd causan una disminución en el contenido de clorofila y de proteínas en las plantas. Abdul Razak (1985) determinó una disminución de la actividad fotosintética y en la síntesis de clorofila por la acumulación de metales pesados. Nuestros resultados coinciden con Yurekli & Porgali (2006) quienes encontraron que la síntesis de clorofila es alterada por altas concentraciones de Cu, como se observó en las plantas no micorrizadas con 1 mM de Cu. Esto puede ser el resultado de la inhibición de una enzima, de su ruta biosintética o por la modificación de la absorción de un nutriente importante (Fe). Ruscitti et al. (2017) determinaron que el contenido de clorofila y proteínas se redujo con el aumento de la concentración de Cu en plantas de pimienta, en coincidencia con este trabajo.

El análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas en la cantidad de MDA en hojas con respecto a los tratamientos de Cu y AS, no habiendo diferencias significativas entre plantas NM y M, mientras que sí se encontraron diferencias significativas en la interacción entre las tres variables analizadas (Figura 3A).

La concentración de MDA es un indicador del estrés oxidativo (Garita, 2012). En la Figura 3B, se puede observar un aumento de los valores de MDA en raíces de las plantas sometidas a estrés con respecto a las plantas sin Cu, en las NM como en las M, lo que sugiere un efecto de estrés oxidativo debido al Cu, que aumenta la actividad de enzimas lipoxigenasas, que catalizan la peroxidación de lípidos tal como lo encontrado por Ahmad et al. (2010). Además, numerosos estudios informan que los niveles de MDA se incrementan en plantas expuestas a tratamientos con MP (Ozounidou, 1994; Yurekli & Porgali, 2006). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de un estrés por concentraciones tóxicas de Cu puede dañar las membranas tilacoidales y alterar el transporte de electrones (Lombardi & Sebastiani, 2005). La aplicación de AS disminuyó la peroxidación de lípidos en el tratamiento con 1 mM de Cu en las plantas micorrizadas (Figura 3A). Nuestros resultados concuerdan con Metwally et al. (2003) que describieron la función protectora del AS en la regulación del estrés oxidativo, generado como consecuencia de elevadas concentraciones de metales pesados en el suelo.

Como se puede observar en la Figura 4A, el contenido de proteínas foliares fue mayor en las plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas y disminuyó frente al estrés por cobre. Esto concuerda con los trabajos de Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi (1995) y Andrade et al., (2008), quienes reportaron mayores niveles de proteínas foliares en las plantas micorrizadas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en todos los tratamientos y en la interacción de las tres variables.

Figura 3: Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de MDA de A) hojas y B) raíces, de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0Cu: 0 mM Cu; 0,1Cu: 0,1 mM Cu; 1Cu: 1 mM Cu. 0AS: 0 μ MAS; 200AS: 200 μ MAS; 500AS: 500 μ MAS.

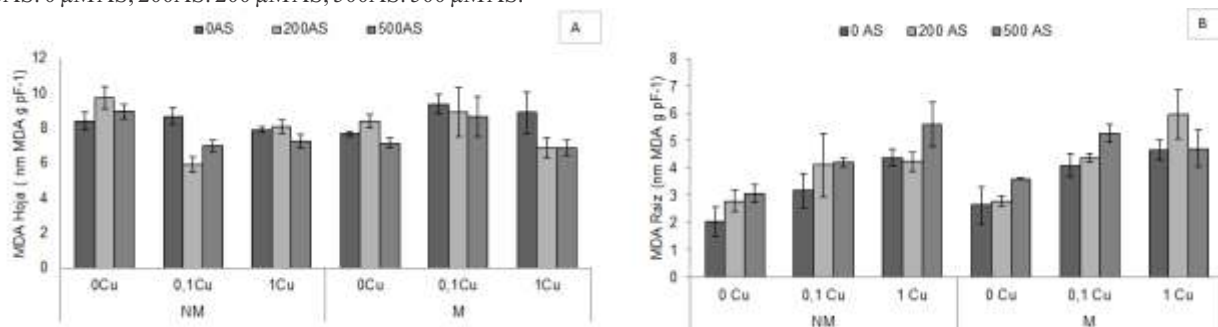


Tabla 5: Análisis de Varianza de los efectos de la micorrización (MICO), Cobre (Cu) y ácido salicílico (AS) y su interacción sobre el contenido de MDA de hojas y raíces.

Fuente de variación	Gl	MDA Hoja		MDA Raiz	
		Cuadrado Medio	Valor-P	Cuadrado Medio	Valor-P
MICO	1	170,5900	0,0573	5,1535	0,0000
Cu	2	246,3200	0,0068	9,0323	0,0000
AS	2	65,9400	0,2285	0,5929	0,0000
INTERACCIONES					
MICOxCu	2	86,2200	0,1482	1,9453	0,0000
MICOxAS	2	3,6000	0,9197	0,2043	0,0086
CuxAS	4	20,3400	0,7541	0,1837	0,0029
MICOxcCuxAS	4	8,6400	0,9593	0,1753	0,0038

Figura 4: Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de proteínas de hoja (A) y de raíces (B), de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0Cu: 0 mM Cu; 0,1Cu: 0,1 mM Cu; 1Cu: 1 mM Cu. 0AS: 0 μ MAS; 200AS: 200 μ MAS; 500AS: 500 μ MAS.

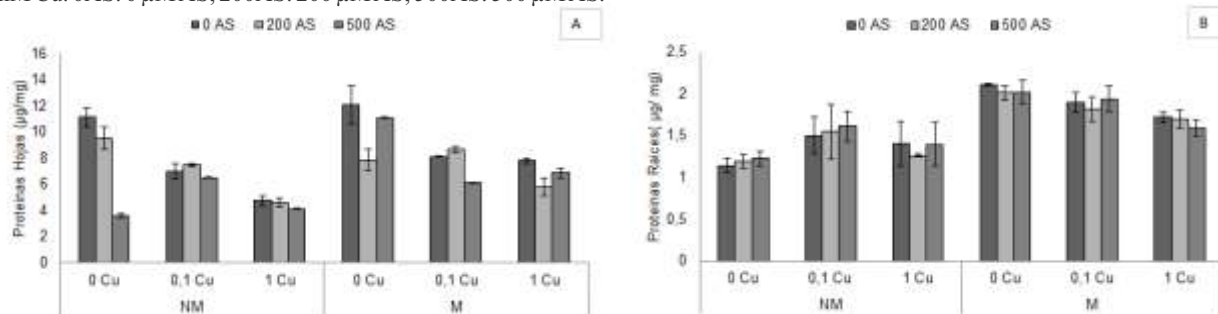


Tabla 6: Análisis de Varianza de los efectos de la micorrización (MICO), Cobre (Cu) y ácido salicílico (AS) y su interacción sobre el contenido de proteínas de hojas y raíces.

Fuente de variación	Gl	PROT Hoja		PROT Raiz	
		Cuadrado Medio	Valor-P	Cuadrado Medio	Valor-P
MICO	1	29,9900	0,0001	3,9513	0,0001
Cu	2	69,0600	0,0001	0,1854	0,0002
AS	2	8,8100	0,0001	0,0077	0,6321
INTERACCIONES					
MICOxCu	2	2,7400	0,0092	0,2515	0,0001
MICOxAS	2	3,4800	0,0031	0,0173	0,3625
CuxAS	4	3,1400	0,0007	0,0102	0,6537
MICOxcCuxAS	4	2,1200	0,0073	0,0048	0,8834

En el caso de las proteínas de raíces, se pudo notar una mayor diferencia entre plantas inoculadas y no inoculadas, presentando estas últimas un menor contenido de proteínas, las cuales se vieron afectadas por las mayores concentraciones de cobre (Figura 4B). El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los tratamientos de micorrización y de Cu y en la interacción de estos dos factores. El AS no mostró diferencias significativas en este parámetro, esto indicaría que la inoculación con MA determinó el aumento de este parámetro. Resultados similares han reportado Jamalabad & Khara (2008) en trigo bajo estrés con cadmio inoculado con *Glomus intraradices*.

Conclusiones

La micorrización aumentó la tolerancia de las plantas de pimiento a altas concentraciones de Cu en el suelo, evidenciado en los valores de peso seco, altura, TCR y área foliar. La aspersión de AS en bajas concentraciones ejerció un efecto sinérgico, posiblemente a través de la inducción de mecanismos de tolerancia al estrés abiótico provocado por el Cu. En este trabajo se observó que el aumento en la concentración de cobre disminuyó la colonización de las raíces de las plantas de pimiento. El incremento de los valores de MDA indicarían un daño en las membranas celulares causada por el Cu. Los valores de índice de verdor y proteínas también se vieron afectados en forma negativa.

En base a lo expuesto, existen evidencias que permiten aceptar la hipótesis planteada en este trabajo, la inoculación con MA y la

El aumento en el contenido de proteínas de las plantas de pimiento micorrizadas, puede deberse a un estímulo de la síntesis de proteínas de novo (Barker et al., 1998) o a una alteración en la expresión de genes (Wyss et al., 1990). Hildebrandt & Bothe (2007), determinaron que la inducción de genes que codifican proteínas involucradas potencialmente en la tolerancia a metales pesados en las plantas micorrizadas podría ser un factor que contribuya a mejorar la respuesta.

aplicación exógena de AS morigeran el efecto perjudicial de las altas concentraciones de cobre en el suelo. Los resultados obtenidos permiten reconocer la importancia de la inoculación con HMA para moderar los efectos adversos causados por las altas concentraciones de Cu en el suelo, mejorando el desarrollo inicial y supervivencia de los cultivos agrícolas de interés comercial, como así también el empleo del ácido salicílico como inductor de mecanismos naturales de defensa de las plantas.

Se concluye que la inoculación con MA y la aplicación de AS podrían mejorar sinérgicamente la tolerancia de las plantas de pimiento a la acumulación de Cu en el suelo, contribuyendo a generar un paquete tecnológico que permita al productor lograr un uso más eficiente de los recursos sobre la base de la

Bibliografía

1. ABDUL RAZAK V (1985) Physiological and biochemical aspects of metal tolerance in *Arachis hypogaea*. PhD thesis. L. MPhil, Tirupati AP, Sri Venkateswara University, AP, India.
2. AHMAD P, JALEEL CA, SHARMA S (2010) Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. Russian Journal of Plant Physiology. 57:509-517.
3. ANDRADE A, PARADA DIAS DA SILVEIRA JORGE RA, FERREIRA DE ABREUA M (2008) Cadmium Accumulation in Sunflower Plants Influenced by Arbuscular Mycorrhiza. International Journal of Phytoremediation. 10: 1-13.
4. BARKER SJ, STUMMER B, GAO L, DISPAIN I, O'CONNOR PJ, SMITH SE (1998) The Plant Journal. 15: 791-797.
5. BELTRANO J, RUSCITTI M, ARANGO C, RONCO M (2013) Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. Theoretical and Experimental Plant Physiology 25: 125-136.
6. BOCER SL (2002) Cultivos protegidos y problemas ambientales: un estudio de la horticultura marplatense en la década del noventa. Tesis de Maestría, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
7. BRADFORD M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
8. CABELLO M (1997) Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). FEMS Microbiology Ecology 22: 233-236.
9. DEL PINO M (2016) Guía didáctica: cultivo y manejo del pimiento. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Curso de Horticultura y Floricultura. pp 1-6.
10. DEMIREVSKA-KEPOVA K, SIMOVA-STOILLOVA L, STOYANOVA Z, HOLZER R, FELLER U (2004) Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. Environmental and Experimental Botany 52: 253-266.
11. DRAZIC G, MIHAILOVIC N (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. Plant Science 168: 511-517.
12. EL-TAYEB MA, EL-ENANY AE, AHMED NL (2006) Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Growth Regulation, 50(2-3), 191-199.
13. GARITA SA (2012) Micorrizas vesículo-arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en tomate. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. pp 50.
14. GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S (1995) Proteins and Protein Activities in Endomycorrhizal Symbioses Mycorrhiza. Chapter 22: 251-266.
15. GUZMÁN-TÉLLEZ E, DÍAZ-MONTENEGRO A, BENAVIDES-MENDOZA (2011) Concentration of salicylic acid in tomato leaves after foliar aspersions of this compound. American Journal of Plant Science 5(13): 2048-2056.
16. HEATH RL, PACKER L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

17. HILDEBRANDT U, BOTHE H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68(1): 139-146.
18. HOAGLAND DR, ARNON DI (1950) The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experiment Station Circular 347.
19. HORVATH E, SZALAI G, JANDA T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 290-300.
20. JAMAL A, AYUB N, USMAN M, KHAN AG (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soyabean and lentil. *International Journal of Phytoremediation* 4 (39): 205-221.
21. JAMALABAD KH, KHARA J (2008) The effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus intraradices* on some growth and physiological parameters in wheat (cv.AZAR2) plants under cadmium toxicity. *Iranian Journal of Biology* 21: 216-230.
22. JONER E, LEYVAL C (2001) Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils*. 33: 351-357.
23. KABATA-PENDIAS, A (2011) Trace elements in soils and plants, 3rd edn. CRC, USA.
24. KAYA C, ASHRAF M, SONMEZ O, AYDEMIR S, LEVENT TUNA A, ALI CULLU M (2009) The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*. 121: 1-6.
25. LIDON FC, HENRIQUES FS (1992) Copper toxicity in rice: diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. *Soil Science* 154: 130-135.
26. LIN AJ, ZHANG XH, WONG M, YE ZH, LOU LQ, ZHU YG (2007) Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. *Environmental Geochemistry and Health* 29:473-481.
27. LINDERMAN RG (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Ed G.J. Bethlenfalvay and R.G. Linderman. Madison, Wisconsin, USA. ASA Special Publication Number 54 p 45-70
28. LIU X, ZHANG S, SHAN X, ZHU YG (2005) Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61: 293-301.
29. LOMBARDIL, SEBASTIANIL (2005) Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science* 168: 797-802.
30. MARQUES APMC, OLIVEIRA RS, SAMARDJIEVA KA, PISSARRA J, RANGEL AOSS, CASTRO PML (2007) *Solanum nigrum* grown in contaminated soil: effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environmental Pollution* 145: 691-699.
31. MARSCHNER H, DELL B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 159(1), 89-102.
32. MARSCHNER H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
33. METWALLY A, FINKEMEIER I, GEORGI M, DIETZ KJ (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132: 272-281.
34. MURPHY A, TAIZ L (1997) Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 Arabidopsis ecotypes. *New Phytology* 136: 211-222.
35. NAVARRO AVIÑÓ JP, AGUILAR ALONSO I, LÓPEZ-MOYA JR (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 2007/2.
36. NOVOA MD, PALMA S. (2010) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* spp. inoculation on alfalfa growth in soils with copper. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 259-265.
37. OZOUNIDOU G (1994) Root growth and pigment composition in relationship to element uptake in *Silene compacta* plants treated with copper. *Journal of Plant Nutrition*. 17: 933-943.
38. PAWLOWSKA TE, CHARVAT I (2004) Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6643-6649.
39. PHILLIPS JM, HAYMAN DS (1970) Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society* 55:159-161.
40. PLENCHETTE C, FORTIN JA, FURLAN V (1983) Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70:199-209.
41. POPOVA L, ANANIEVA E, HRISTOVA V, CHRISTOV K, GEORGIEVA K, ALEXIEVA V, STOINOVA Z (2003) Salicylic acid-and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 21: 133-152.
42. RABIE GH (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, 332-345.
43. RUSCITTI M, ARANGO M, RONCO M, BELTRANO J (2011) Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23: 15-25.
44. RUSCITTI M, ARANGO M, BELTRANO J (2017) Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* DOI 10.1007/s40626-016-0081-7. e-ISSN 2197-0025.
45. SARABIA OCHOA M, MADRIGAL PEDRAZA R, MARTÍNEZ TRUJILLO M, CARREÓN ABUD Y (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones, *Biologicas*, [online]. Vol. 12, Art. 1.
46. SCHWARTZ C, ECHEVARRÍA G, MOREL JL (2003) Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*. 249: 27-35.
47. SINGH B, USHA K (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, v. 39, n. 2, pp. 137-141.
48. SMITH SE, GIANINAZZI-PEARSON V (1990) Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 17:177-188.
49. SOUZA CASADINHO OJ, BOCERO SL (2008) Agrotóxicos: condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica* 9: 87-101.

50. **TROUVELOT A, KOUGH J, GIANINAZZI-PEARSON V** (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects. INRA-Press, Dijon, France. p.217-221. (Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. eds).
51. **VAILLANT N, MONNET F, HITMIA, SALLANON H, COUDRET A** (2005) Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59: 1005-1013.
52. **WYSS P, MELLOR RB, WIEMKEN A** (1990) Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22-26.
53. **YADAV SK** (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76:167-179
54. **YUREKLI F, PORGALI ZB** (2006) The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48/2: 7-13.
55. **ZHANG Y, XU S, YANG S, CHEN Y** (2015) Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma*, 252(3), 911-924. *ra*. México, Editorial Grimaldo.